# Synthese, Verteilung und Ausscheidung neuer aktiver Derivate des polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen

Heinrich Kremer

1972

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen
Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Eugen Werle

# Synthese, Verteilung und Ausscheidung neuer aktiver Derivate des polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwigs Maximilians Universität zu München

vorgelegt von
Heinrich Kremer

aus
Meisenheim

Jahr
1970

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof.Dr.Dr. E. Werle |
| Mitberichterstatter: | Priv. Doz. H. Fritz |
| Dekan: | Prof. Dr. W. Spann |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 4. Juli 1972 |

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen lieben Eltern
- in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis


Seite

Einleitung ..... 1

1. Theoretischer Teil ..... 2

1.1. Historisches ..... 2

1.2. Inhibitortherapie, bei der der Mechanismus bekannt oder experimentell erforscht ist ..... 4

1.2.1. Inhibitortherapie bei Pankreatitis ..... 4

1.2.2. Inhibitortherapie bei Schockzuständen ..... 6

1.2.3. Inhibitortherapie bei hyperfibrinolytischen Blutungen 10

1.3. Therapiemöglichkeiten, deren biochemischer Mechanismus noch sehr hypothetisch ist ..... 11

1.3.1. Inhibitortherapie der Fettembolie ..... 11

1.3.2. Inhibitortherapie bei Wund- und Frakturheilung ..... 12

1.3.3. Intraartikuläre Inhibitortherapie ..... 12

1.3.4. Inhibitortherapie bei Ödemen ..... 12

1.3.5. Weitere Literaturhinweise über Inhibitormedikation .. 13

1.4. Verteilung und Ausscheidung des nativen Inhibitors .... 13

2. Experimenteller Teil ..... 15

2.1. Quantitative Bestimmung von Trypsininhibitoren ..... 15

2.2. Synthese von aktiven Derivaten des polyvalenten Inhibitors aus Rinderorganen ..... 17

2.2.1. Synthese des Succinyl-Inhibitors ..... 17

2.2.2. Synthese des C.M.Succinyl-Inhibitors ..... 21

2.2.3. Synthese des Homocystein-Inhibitors ..... 22

2.3. Verteilung und Asscheidung der neuen Derivate ..... 22

2.3.1. Bestimmung von Leerwerten ..... 22

2.3.2. Beschreibung neuer Inhibitoren im Rattenfutter ..... 26

2.3.3. Verteilung des Succinyl-Inhibitors ..... 27

2.3.4. Verteilung des C.M. Succinyl-Inhibitors ..... 31

2.3.5. Verteilung des Homocystein-Inhibitors ..... 35

2.4. Diskussion ..... 37

2.4.1. Synthese der aktiven Derivate ..... 37

2.4.2. Verteilung des nativen Inhibitors im Vergleich mit der Verteilung der aktiven Derivate ..... 40

2.4.3. Vergleich der Verteilung des Maleoyl-Inhibitors mit dem Succinyl-Inhibitor ..... 42

2.5. Zusammenfassung ..... 45

Literaturverzeichnis ..... 46

## Einleitung

In der Klinik wird der polyvalente Proteinaseninhibitor Trasylol $^{R}$ vielseitig eingesetzt. Er verläßt nach intravenöser Injektion rasch die Blutbahn und wird in den Nieren fixiert. Diese Eigenschaft ist nicht nur unerwünscht, da sie die Wirkzeit des Inhibitors auf das zu hemmende Enzym herabsetzt, sondern beeinträchtigt möglicherweise die Nierenfunktion.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch chemische Modifikation des nativen Inhibitors neue Eigenschaften im Hinblick auf die Verteilung und die Nierengängigkeit festzustellen. Beschrieben wird die Synthese des aktiven Succinyl-Inhibitors, des CM-Succinyl-Inhibitors und des Homocystein-Inhibitors sowie deren Verteilung und Ausscheidung.

## 1. Theoretischer Teil

Der polyvalente Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, Handelsname Trasylol $^{R}$, ist einer der ersten Inhibitoren gewesen, die man entdeckt hat. Dank seiner vielfältigen Eigenschaften - er hemmt Trypsin, Kallikrein, Chymotrypsin, Plasmin, Plasminaktivator, Faktor VIII und IX der Blutgerinnung (1), Papain und Pronase (24) - hat er große Verbreitung in der Klinik gefunden und viele namhafte Wissenschaftler haben sich um die therapeutische Verwendbarkeit verdientgemacht. Wie stark das Interesse der Fachwelt an diesem Inhibitor gewachsen ist, zeigt die Angabe von HABERLAND (1), der im Jahre 1967 über 1500 Originalarbeiten aus den verschiedensten Fachbereichen zählte, die sich mit dem Inhibitor befassen.

1.1. Der von KRAUT, FREY und WERLE 1930 in Parotis, Milz und Leber des Rindes gefundene Inhibitor war zunächst nur durch seine Hemmwirkung auf Kallikrein bekannt (20). Eine Arbeitsgruppe von KUNITZ isolierte aus Rinderpankreas einen Hemmstoff für Trypsin, die Arbeitsgruppe von ASTRUP einen Hemmstoff für Plasmin aus Lungenextrakten des Rindes (21, 22). Der Zusammenhang dieser scheinbar verschiedenen Inhibitoren wurde von WERLE hergestellt, indem er eine antitryptische und antichymotryptische Wirkung des von KRAUT, FREY und WERLE entdeckten Kallikrein-Inhibitors fand und nachwies, daß der KUNITZ-Inhibitor Kallikrein hemmt und der von ASTRUP gefundene Inhibitor sich verhält wie der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (23). Etwas später kam die Erkenntnis hinzu, daß alle diese Inhibitoren auch Plasmin hemmen können. Damit war erwiesen, daß die Inhibitoren aus verschiedenen Organen identische Hemmspektren aufweisen. Die Frage nach der Identität des Moleküls mußte natürlich der Aminosäureanalyse vorbehalten bleiben. Nach den Arbeiten von LASKOWSKI und ANDERER sind die Inhibitoren aus Lunge, Parotis und Pankreas des Rindes identisch (10).

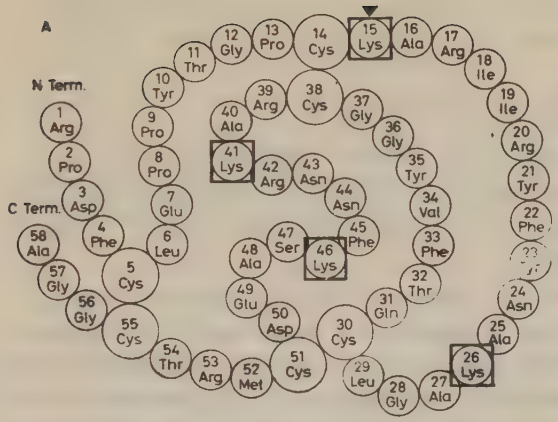



*Abb. 1. Primärstruktur des Trasylol-Moleküls.*

Dank seines großen Hemmspektrums ist der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor für therapeutische Zwecke besonders gut geeignet. Das relativ niedrige Molekulargewicht von 6513 nach der Aminosäurezusammensetzung erlaubt dem Inhibitor, rasch aus der Blutbahn in den Extracellularraum zu diffundieren. Außerdem wirken Moleküle dieser Größe nicht als Antigene. Sensibilisierung mit dem Inhibitor kommt sehr selten vor.

Die therapeutischen Möglichkeiten des Inhibitors sind zahlreich, so zahlreich wie die im Verlauf pathophysiologischer Prozesse auftretenden Proteasen, die man vielleicht in ihren Auswirkungen beeinflussen könnte. Es existiert auch eine große Zahl von statistischen Arbeiten, die einen günstigen therapeutischen Effekt beschreiben, ohne daß man diesen Effekt auf die Hemmung von Proteasen mit einiger Sicherheit zurückführen könnte. Ich möchte daher die Krankheitsbilder, bei denen die Inhibitortherapie beschrieben oder vorgeschlagen wird, einteilen in solche, bei denen der biochemeische Mechanismus bekannt oder doch zumindest experimentell erforscht ist, und in solche, bei denen der Wirkmechanismus noch mehr oder weniger hypothetisch erscheint.

1.2. Therapiemöglichkeiten, bei denen der biochemische Mechanismus bekannt oder zumindest experimentell erforscht ist.

1.2.1. Inhibitortherapie bei Pankreatitis

Es erscheint verwunderlich, dieses Krankheitsbild an den Anfang zu stellen, da die Inhibitortherapie bei Pankreatitis gerade in der jetzigen Zeit umstritten ist. Dennoch erscheint es mir berechtigt.

Bei der Pankreatitis wurden die Proteaseninhibitoren zum ersten Mal von FREY therapeutische eingeführt (35). Man ging dabei von folgenden Vorstellungen aus. Die Pankreatitis entsteht durch vorzeitige Aktivierung der in den Zymogengranula eingelagerten Proenzyme von Proteasen, Lipasen und Amylasen. Es handelt sich also um einen Selbstverdau des Pankreas, eine Autodigestion. Da der Inhibitor Proteasen, wie die im Pankreas gebildeten Enzyme Trypsin und Chymotrypsin, sowie das Pankreas-Kallikrein hemmt, wäre eine Inhibitortherapie die kausale Therapie dieses Krankheitsbildes. Diese Vorstellung gilt aber nach heutiger Anschauung als zu vereinfacht. Man hat in mehreren Arbeitsgruppen versucht, eine pathogenetisch bedeutsame Trypsinaktivierung bei der Pankreatitis ohne Erfolg nachzuweisen (2 u. 5). Man ist vielmehr zu der Überzeugung gekommen, daß die Phospholipase A, die das stark cytotoxische Lysolecithin bildet, den entscheidenden pathogenetischen Faktor darstellt und für die Pankreasnekrose von viel größerer Bedeutung ist als die Aktivierung der Pankreasproteasen.

Auch ist die Bedeutung des Inhibitors für die Kallikrein-Inhibition im Verlaufe dieses Krankheitsbildes recht fragwürdig geworden. Die vom Kallikrein gebildeten Kinine zeichnen sich durch stark pharmakologische Wirkung aus, wie durch Kontraktion der glatten Muskulatur, Veränderung der Gefäßpermeabilität, Erzeugung von Schmerzempfindung und Leukozytenanlockung. Diese Eigenschaften ließen sie geeignet erscheinen im Mechanismus des Ödems und im Mechanismus des Schocks eine bedeutende Rolle zu spielen. Bei der Pankreatitis ist der

Schock die gefürchtetste Komplikation. Die Patienten sterben nicht an der Pankreatitis sondern am Kreislaufschock (3). Es gibt eine ganze Reihe von Untersuchungen, die den Kininen eine große Rolle beim postpankreatitischen Schock zusprechen. (4, 8 u. 9). Diese Untersuchungen sind aber von HABERMANN in Frage gestellt worden (6). Nach seinen Untersuchungen hat der menschliche Organismus gar nicht genügend Kininogen, um damit einen Schock für längere Zeit aufrechtzuerhalten. Die als Maß für die Kininfreisetzung gewertete Kininogenabnahme ist insofern nicht verwertbar, da im Schock durch Änderung der Gesamteiweißfraktionen des Plasmas die Proteine stark absinken. Außerdem ist die Messung der Kininogene problematisch, weil das Kininsystem durch Glaskontakt aktivierbar ist. Folglich wird bei Messungen in Glasröhrchen der Kininogenwert ständig erniedrigt sein.

Die Vorstellung, daß durch die Hemmung der Kininproduktion der Schock kausal therapiert werden könne, wird heute mit dem Argument bestritten, die Kinine wären nicht kausal für den Schock verantwortlich. Die Proteaseninhibitortherapie ist somit bei der Pankreatitis und ihrem Schock fraglich geworden, nicht nur weil die Trypsinaktivierung offensichtlich unbedeutend ist, sondern weil auch der Schockzustand mit dem Inhibitor nicht kausal angegangen werden kann. Dabei ist es keineswegs ausgeschlossen, daß die Kinine nicht lokal eine Rolle spielen.

Eine weitere Wirkung des Inhibitors auf das Bild der Pankreatitis liegt in seiner Fähigkeit, das Gerinnungssystem zu stabilisieren. Diese Eigenschaft erweist sich als sehr bedeutungsvoll für eine Reihe von Schockzuständen und damit auch für den postpankreatitischen Schock. Im Verlaufe eines Schocks kommt es immer zu einer Abnahme der frei zirkulierenden Blutmenge (43). Beim postpankreatitischen Schock kommt es durch das Pankreasödem zu einer Hypovolämie und im Bereich des Organs zur Hämostase mit intravasaler Gerinnung. Dank seiner antifibrinolytischen und antithromboplastischen Eigenschaften, auf die ich später noch genauer eingehen werde,

vermag der Inhibitor über die Stabilisierung der Blutgerinnung auf den Schock einzuwirken.

Zusammenfassend möchte ich über die Proteaseninhibitortherapie der Pankreatitis sagen, daß ihr Wert sicher überschätzt wurde. Die Bedeutung der Trypsinaktivierung und der Kininbildung erscheint nach den neueren Experimenten nicht mehr ausschlaggebend. Proteaseninhibitoren wird man aber dennoch applizieren und zwar, um die lokalen Kinin- und Proteaseneffekte zu mildern und um die Gerinnung zu stabilisieren. Kausal wird man diese Therapie aber ruhigen Gewissens nicht nennen können.

### 1.2.2. Inhibitortherapie bei Schockzuständen

Eng verwandt mit der Pathogenese der Pankreatitis ist die der Peritonitis, des Endotoxinschocks, des Verbrennungsschocks, des Entblutungsschocks, der Fettembolie. Da bei diesen Zuständen oft nur das auslösende Moment unterschiedlich ist, möchte ich sie und ihre Behandlung gemeinsam besprechen. Zum besseren Verständnis der sich einerander beeinflussenden Faktoren soll eine schematische Zusammenstellung vorweggestellt werden.

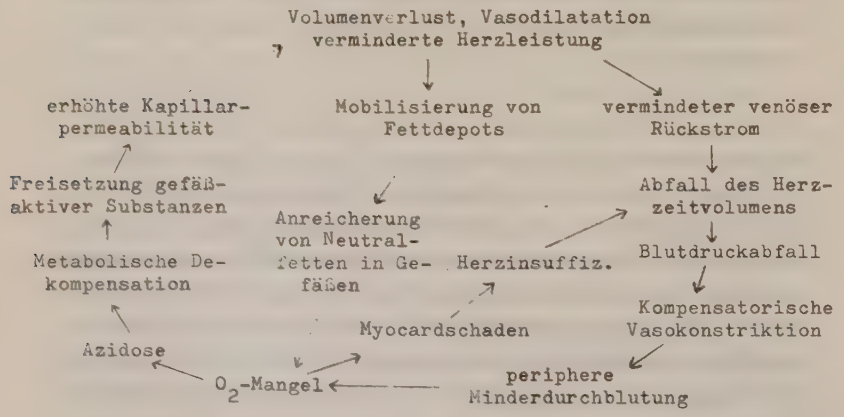



Abb. 2 Schematische Darstellung der Schockfolgen und Schockursachen, etwas modifiziert nach WERLE (46)

Wie schon erwähnt, besteht der Schock in der Abnahme der frei zirkulierenden Blutmenge. Dies führt zu einer allgemeinen Verminderung der Gewebsdurchblutung mit Hämostase und lokaler Hypoxie. Die Folge der lokalen Hypoxie besteht darin, daß der Zellstoffwechsel auf anaerobe Glykolyse "umschaltet" und statt $CO_2$ und $H_2O$ Milchsäure synthetisiert. Dies führt zu einer metabolischen Azidose des Gewebes, einer Änderung der Permeabilität und zu einem lokalen Ödem. Durch dieses Ödem wird das in den Gefäßen befindliche Volumen geringer und die Gerinnungsbereitschaft größer, so daß letzlich ein circulus vitiosus Minderdurchblutung - Ödem - Minderdurchblutung entsteht. Befunde aus Experimenten über Auslösung und Beeinflussung des Schocks sind wegen der multifaktoriellen Genese dieses Zustandsbildes schwierig zu beurteilen.

Wie auch beim postpankreatitischen Schock hat man den Kininen in diesem Mechanismus eine entscheidende Rolle zugesprochen, und viele Untersuchungen befassen sich mit dem experimentell nachweisbaren Abfall des Kininogens im Blut (4, 7, 8 u. 9). Leider lassen sich die Kinine selbst im Blut nicht bestimmen, da ihre biologische Halbwertszeit im Sekundenbereich liegt. Sie werden sofort von Carboxypeptidasen abgebaut. Die Eigenschaften der Kinine lassen sie aber sehr geeignet erscheinen, eine wesentliche Rolle in dem komplizierten Mechanismus des Schocks zu spielen. Die zahlreichen Untersuchungen über die Kininogenmengen im Verlauf der verschiedenen Zustände sind aber nach HABERMANN (6) nicht verwertbar oder bedürfen einer neuen Interpretation.

Der Inhibitor wirkt aber nicht nur auf die in ihrer Bedeutung umstrittene Kininbildung ein, sondern auch auf die Stabilität der Blutgerinnung.

Wie schon eingangs erwähnt, hemmt der Inhibitor in einer Konzentration von 100 000 - 500 000 KIE/die die Aktivität von Fibrinolysin (Plasmin) (10). Dieses Enzym spielt in der Gerinnungsphysiologie eine große Rolle. Es ist nämlich

in der Lage, die sich ständig bildenden Fibringerinnsel aufzulösen. In unserem Gefäßsystem findet ständig eine latente Gerinnung und Fibrinolyse statt. Gefährlich wird dies dann, wenn der ausgewogene Zustand aus dem Gleichgewicht gerät. Wie notwendig dieser laufende Vorgang des Gefäßabdichtens ist, sieht man bei solchen Patienten, die dazu nicht mehr in der Lage sind. Es kommt zu schwer beherrschbaren Blutungen. Mit dem Inhibitor kann man das Plasmin und den Plasminaktivator (10) hemmen und damit das Fibrinolysesystem entscheidend beeinflussen.

Zu diesem antifibrinolytischen Effekt kommt auch noch eine Hemmwirkung auf das Gerinnungssystem. Bei hohen Dosen (500 000 - 1,5 Mill. KIE/die (10)) bemerkte MARX, daß die Gerinnungszeit sich verlängerte. Bei der Analyse der einzelnen Faktoren fand man, daß das Thrombin nicht durch den Inhibitor hemmbar war. Es mußte sich demnach um die Hemmung eines oder mehrer Faktoren in der Vorphase der Gerinnung handeln. Nach HABERLAND handelt es sich dabei um die Faktoren VIII und IX (1).

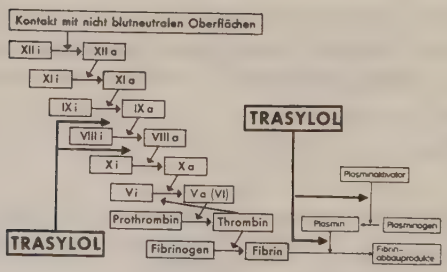



Abb. 3 Schema der Gerinnungskaskade mit dem Wirkungsort des Proteaseninhibitors

Durch seinen Einfluß auf das Plasmin und den Plasminaktivator hat der Inhibitor einen antifibrinolytischen Effekt, bei höheren Dosen durch die Hemmung der Vorgerinnungsphase einen antithromboplastischen Effekt.

Im Verlaufe einer Hämostase kommt es immer zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems (11) und damit gleichzeitig zur Aktivierung der Fibrinolyse. Die zu Beginn des Schocks im Vordergrund stehende Hyperkoagulabilität äußert sich in Form von Fibrinablagerungen an der Gefäßwand und bei schweren Fällen in Form von Mikrothromben in den peripheren Gefäßen. Die anfängliche Hyperkoagulabilität des Blutes geht dann durch eine massive Aktivierung des Fibrinolysepotentials in eine Hypokoagulabilität über. Die Aktivierung der beiden Systeme kann in schwersten Fällen soweit gehen, daß es zu einem Verbrauch sämtlicher Faktoren sowohl der Gerinnung als auch der Fibrinolyse kommt. Dieses Bild bezeichnet man als Verbrauchskoagulopathie. Klinisch findet man es bei schwerster Sepsis (Koli, Meningokokken) beim Endotoxinschock und bei akuten Leukämien (12). Es geht einher mit generalisierter Blutungsneigung, Nierenrindennekrose und Anurie.

Diesen oft tödlichen Ausgang kann man mit Hilfe des polyvalenten Inhibitors beeinflussen. Die antifibrinolytische und die antithromboplastische Wirkung erscheinen geeignet, sowohl das Gerinnungs- als auch das Fibrinolysesystem zu zügeln, so daß sich das Bild der Verbrauchskoagulopathie gar nicht ausbilden kann. Die Therapie muß aber rechtzeitig, d.h. schon prophylaktisch einsetzen. Sollten sich schon intravasale Gerinnsel gebildet haben, so ist die Inhibitortherapie kontraindiziert (13 u. 14). Da der Inhibitor das Plasmin stärker hemmt als die Vorgerinnungsphase, würden die Mikrothromben längere Zeit existieren als ohne Inhibitor und der hypoxische Schaden der Organe würde sich verstärken. BEGEMANN empfiehlt in solchen Fällen trotz drohender hämorrhagischer Diathese eine fibrinolytische Therapie mit Streptokinase (15).

Abschließend möchte ich zu diesen etwas vereinfacht dargestellten Problemen der Schocktherapie mit Proteaseninhibitoren sagen, daß sie in Sonderfällen schon noch eine Rolle spielen, auch wenn früher die Bedeutung der Kinininhibition überschätzt worden ist. Volumen und Elektrolytersatz scheinen aber von größerer Wichtigkeit zu sein als die Gabe von Proteaseninhibitoren. Für die routinemäßige Anwendung von Inhibitoren fehlen überzeugende experimentelle und klinische Unterlagen , MESSMER, (43).

### 1.2.3. Inhibitortherapie bei hyperfibrinolytischen Blutungen

Wie oben ausgeführt, stehen Fibrinolyse und Gerinnung in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Steigerung fibrinolytischer Aktivitäten bei Operationen im Bereich von Prostata, Uterus und Lunge bewirkt eine hämorrhagische Diathese. Die pathologisch gesteigerte Fibrinolyse zerstört nicht nur das Fibrin, sondern auch andere gerinnungswichtige Plasmaproteine wie Fibrinogen, Faktor V und VII (16). Das Fibrin wird dabei enzymatisch in Polypeptide aufgespalten, die wiederum als Antipolymerasen gerinnungsphysiologische Aktivität besitzen und die Polymerisation von Fibrinmonomeren verhindern (16 u. 17).

In der Gynäkologie haben diese hyperfibrinolytischen Blutungen eine besondere Bedeutung erlangt. Im Uterusmyometrium finden sich gehäuft Aktivatoren der Fibrinolyse (18). Bei allen Blutungen aus dem Uterus ist die Fibrinierung verzögert. So ist es verständlich, daß auch das Menstruationsblut nicht gerinnt. Ohne Fibrinolyseaktivatoren würde schon nach der Menarche die Wunde des Endometriums verkleben und das Cavum uteri verwachsen.

Bei Operationen an diesem Organ kommt es nicht nur zu einer Verlängerung der Blutungszeit, sondern in schweren Fällen, besonders nach Aborten oder vorzeitiger Plazentalösung, zu lebensgefährlichen Blutungen, die chirurgische nicht z.B. durch Ligaturen oder Umstechungen gestillt werden können (19).

In diesen Fällen können die Blutungen kausal mit Fibrinolyseinhibitoren therapiert werden. Als spezifisches Hämostyptikum bei hyperfibrinolytischen Blutungen ist der Proteaseninhibitor von großer Bedeutung.

## 3. Therapiemöglichkeiten, deren biochemischer Mechanismus noch hypothetisch ist.

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Therapiemöglichkeiten nehmen im Rahmen der von mir durchgesehenen Literatur einen geringeren Raum ein, als die im ersten Abschnitt diskutierten Ergebnisse. Dies liegt vielleicht daran, daß die folgenden Krankheitsbilder pathogenetisch noch nicht so gut erforscht sind. Es wäre aber nicht gerechtfertigt, diese Therapiemöglichkeiten bzw. Therapieversuche zu unterschlagen, will man den vielfältigen therapeutischen Möglichkeiten dieses Inhibitors Rechnung tragen. Bei den folgenden Untersuchungen handelt es sich meist um statistische Erfassungen, die bei einem Krankenkollektiv mit und ohne Inhibitortherapie deutliche Unterschiede in der Genese feststellen. Es muß nicht besonders betont werden, daß es sich beim Vergleich solcher Kollektive um eine problematische Angelegenheit handelt, wenn es um die Wahl der Kriterien geht, nach denen man den Patienten einer oder der anderen Gruppe zuteilt. So erstaunt es nicht, daß verschiedene Untersucher zu verschiedenen Ergebnissen kommen, ja daß sogar Doppelblindversuche unterschiedliche Ergebnisse bringen.

### 3.1. Therapie der Fettembolie

Einer Fettembolie geht immer ein Schock voraus. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von Triglyceriden aus den Körperdepots in die Lunge und in andere Organe. Nach MÖRL und HELLER (25,26) soll der Proteaseninhibitor die Konzentration an freien Fettsäuren und an Phosphatiden anheben, die für die Emulgierung der Triglyceride von großer Bedeutung sind. Bedeutsamer als dieser therapeutische Effekt erscheint mir der günstige Einfluß des Inhibitors auf den Schock.

1.3.2. Therapie bei Wund- und Frakturheilung

Im Bereich frischer Frakturen ist eine gesteigerte Proteolyse nachweisbar (27), die möglicherweise durch den Inhibitor beeinflußbar ist. Die unter Inhibitortherapie geheilten Brüche weisen nach tierexperimentellen Untersuchungen eine höhere Zugkraft auf.

Auch die Wundheilung soll sich mit dem Inhibitor beeinflussen lassen; dieser Effekt läßt sich vielleicht über die Hemmung lokaler Kallikreinaktivität erklären.

Wie VORSTER (28) an Tierexperimenten zeigte, hemmt der Inhibitor auch die Neigung zu Verwachsungen in der Bauchhöhle nach operativen Eingriffen. Intraperitoneale Verwachsungen sind ein großes Problem der Bauchchirurgie, da sie u.U. einen Ileus oder Verwachsungen auslösen können. Da die Verklebung der Serosaflächen durch Fibrin erfolgt, ist diese antiadhäsive Wirkung mehr ein Gerinnungsproblem.

1.3.3. Intraartikuläre Inhibitortherapie

Die intraartikuläre Inhibitorapplikation ist erst seit kurzem bekannt (29). Sie geht von der Vorstellung aus, daß bei degenerativen und entzündlichen Prozessen in den Gelenken proteolytische Enzyme bedeutsam sind, die es zu hemmen gilt. Über die Bedeutung dieser Therapie wird die Zukunft entscheiden.

1.3.4. Inhibitortherapie bei Ödemen

Bekanntlich verändern die Kinine die Permeabilität der Gefäßwand. So lassen sich Rattenpfotenödeme, die durch intraplantare Injektion von Dextran, Serotonin, Formalin erzeugt werden, mit dem Proteasenhemmkörper gut beeinflussen (30). Diese Möglichkeit kann man bei allerlei Ödemen ausnutzen, wie z.B. beim Hirnödem postoperativ (31) oder bei perinatalen Zirkulationsschäden. Bei länger andauernder Asphyxie während der Geburt kommt es zu perivasalen Ödemen und Diapedeseblutungen (32). Die Untersuchungen der Klinik und Pathogenese solcher Zustände reichen aber noch nicht aus, um ein abschließendes Urteil über den Wert dieser Therapie zu geben.

1.3.5. Weitere Literaturhinweise über Inhibitormedikation

Bei rechtzeitiger Inhibitorgabe wurde im Verlauf des Nierenversagens regelmäßig eine rasche Zunahme der Diurese beobachtet (33).

Der Inhibitor erhöht bei dosierter Arbeit die $O_2$-Aufnahme und das Atemminutenvolumen. Dadurch wird sowohl der Milchsäure- als auch der Brenztraubensäurespiegel erniedrigt (34).

Die im Krankenbett durch die Inaktivität auftretende Durchblutungsminderung und beginnende Ödembereitschaft läßt sich durch einmalige Applikation von 400 000 KIE beheben.

Die Reihe der in der Literatur beschriebenen Behandlungserfolge läßt sich noch erheblich verlängern. Auch wenn ihr Wert in vielen Fällen noch nicht erwiesen ist, so gibt diese Übersicht doch einen Einblick in die Bedeutung dieses Medikamentes und zeigt die Hoffnung, die man auf den Inhibitor setzt.

.4. Verteilung und Ausscheidung des polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors nach intravenöser Injektion

Der Inhibitor weist eine für Eiweißkörper bemerkenswerte Stabilität auf, die im sauren Bereich bis pH 1 und im alkalischen Milieu bis pH 11 reicht. Bei pH 11 und 25 °C sind nach 72 Std. noch 75% der eingesetzten Aktivität nachweisbar (36). Andere Proteine wären bei diesen extremen Bedingungen schon längst denaturiert. Diese Stabilität des Inhibitors läßt sich nur mit besonderen sterischen Verhältnissen des Moleküls erklären, über die man heute noch keine exakten Aussagen machen kann.

Die Säurestabilität des Inhibitors machten sich TRAUTSCHOLD und WERLE (37) für die quantitative Bestimmung des Inhibitorgehalts in Geweben und im Blut zunutze. Sie fanden, daß im Plasma 6% Perchlorsäure im Volumenverhältnis 1:1 die Plasmaproteine ausfällt, während der säurestabile Inhibitor in Lösung bleibt. Durch Abzentrifugieren der ausgefällten Eiweisse und anschließende Neutralisation läßt sich eine

Lösung gewinnen, deren Inhibitorgehalt man bequem messen kann. Mit dieser Methodik war es möglich, das Schicksal des Inhibitors zu verfolgen. Die zahlreichen Arbeiten, die sich mit der Verteilung und Ausscheidung des Hemmkörpers befassen (38, 39 u. 37), stimmen in den wesentlichen Punkten überein. Nach intravenöser Injektion findet man einen raschen Abfall der Inhibitorkonzentration im Blut. Nach FORELL (39) findet man 60 min. nach Injektion von 150 000 KIE nur noch 1/6 der Aktivität im Blut. Nur geringe Mengen lassen sich in Lunge, Milz und Pankreas nachweisen, während die Nieren schon 30 min. nach Applikation etwa 75% der injizierten Aktivität enthalten.

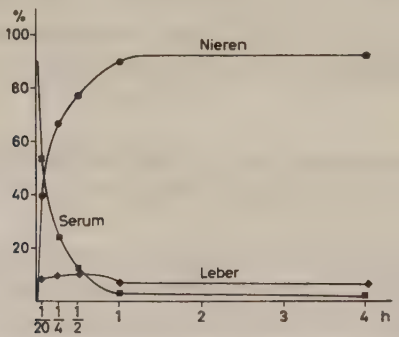



*Abb. 4. Verteilung von Trasylol nach i. v. Injektion von 18000 KIE/kg Körpergewicht auf Blut (Serum), Leber und Nieren der Ratte. Ordinate: % Inhibitor, bezogen auf die jeweilige Inhibitormenge in Serum plus Leber plus Nieren = 100 %; Abszisse: Zeitpunkt nach Injektion des Inhibitors.*

Bei Patienten mit Niereninsuffizienz findet man dagegen eine wesentlich höhere Konzentration an Inhibitor im Blut. Auch im Tierexperiment läßt sich ein solcher Zustand durch Unterbinden der beiden arteriae renales herstellen.

Die in den Nieren fixierte Aktivität nimmt langsam ab, bis sie nach 6 Tagen auf etwa 5% der injizierten Aktivität gesunken ist. Im Harn tritt jedoch nur eine sehr geringe Inhibitoraktivität auf. Mit tritiummarkiertem Inhibitor konnte man nachweisen, daß nach 6 Tagen 70% der injizierten Aktivi-

tät im Harn erscheinen, davon aber nur 12% in biologisch aktiver Form (36). Der native Inhibitor wird also in der Niere zum größten Teil inaktiviert und nur in geringen Mengen aktiv ausgeschieden. Bei der experimentellen Überprüfung dieses Befundes fanden wir im Rattenurin 24 Std. post injektionem 8,3% der injizierten Menge. Das Ergebnis paßt gut zu den obigen Werten. Inwieweit ein Teil des Proteaseninhibitors in der Niere metabolisiert wird, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Quantitative Bestimmung von Trypsininhibitoren

Der Inhibitorgehalt einer Lösung wird aus der Verminderung der Extinktionszunahme gegenüber einem Ansatz ohne Inhibitor, dem Trypsinleerwert, berechnet.
Trypsin spaltet die C-ständigen Peptidbindungen basischer Aminosäuren. Während man früher natürliche Substrate wie Casein, Fibrin und Gelatine dem Enzym anbot und je nach dem Grad der Verflüssigung die Stärke der Enzymwirkung abschätzte, benutzt man heute wegen der ungleich größeren Genauigkeit synthetische Substrate wie z.B. BAPNA, $N^{\alpha}$ - Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (45). Der in dieser Verbindung C-ständig zur basischen Aminosäure Arginin gebundene Farbstoff p-Nitroanilin weist im Molekularverband keine Lichtabsorption auf. Wird er aber durch die Enzymeinwirkung freigesetzt, so färbt er die Lösung buttergelb. Die Extinktionsänderung wird im Eppendorfphotometer (Netheler und Hinz, Hamburg) bei 405 nm gemessen.

Die Enzymeinheit (E) ist die Menge Enzym, die unabhängig vom Reinheitsgrad des Enzyms 1 Mol Substrat/min unter Standardbedingungen umsetzt. Die Inhibitoreinheit (IE) ist die Menge an Inhibitor, die unter Standardbedingungen die Aktivität von 1 E hemmt. Um auszudrücken, daß die Messung bei 50% Hemmgrad ausgeführt werden muß, definiert man: 1 IE ist die Inhibitormenge, die unter Standardbedingungen die Aktivität von 2 E zu 50 % hemmt(24).

Unter Standardbedingungen führt 1 ImE (ImU = Inhibitormillieinheit) zur Reduktion der bei 405 nm gemessenen Extinktion um $\Delta E = 0{,}00332/min$, 3 ml. Daraus folgt, daß 1 mE (mU) Trypsin ebenfalls eine Extinktionsänderung von $\Delta E = 0{,}00332/min$, 3 ml bewirkt.

Material: Trypsinlösung: 15 mg Trypsin (Trypure Novo) wird in 300 ml 0,0025 N HCl gelöst. 0,2 ml Trypsinlösung enthalten 10 γ Trypsin. Herstellung eines 0,2 M TRA-Puffers, der 0,01 M $Ca^{++}$ enthält: Man löst 18,6 g Triäthanolaminhydrochlorid (Merck Darmstadt) in 500 ml Aqua dest., gibt 735 mg $CaCl_2$ zu und stellt mit NaOH auf pH 7,8 ein.

Herstellung einer Lösung von BAPNA (1 mg/ml): 1 g BAPNA (Merck Darmstadt) wird in einem Liter Aqua dest. suspendiert und erhitzt. Bei etwa 80°C geht das BAPNA in Lösung. Man darf nicht zu lange und zu hoch erhitzen, da sonst das BAPNA verseift.

Mißt man Inhibitorlösungen, so gibt man zu der vorgelegten Trypsinlösung den Inhibitor und ergänzt mit dem Puffer auf 2 ml. Dabei sollte die Testlösung 1 ml nicht überschreiten, um die Konstanz des pH-Wertes zu gewährleisten. Eine Inkubationszeit von 5 min. genügt in den meisten Fällen. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Substratlösung gestartet. Aus der Abnahme der Extinktionsänderung gegenüber dem Leerwert errechnet sich der Gehalt an ImU.

Methodik:

0,2 ml Trypsinlösung (10 mU)
0,X ml Inhibitorlösung
(1,8 - 0,X) ml TRA-Puffer pH 7,8, 25 °C

5 min inkubieren
1,0 ml Substratlösung BAPNA, 25 °C

Die bei 405 nm gemessene Extinktionsänderung wird mindestens 5 min lang abgelesen und der Mittelwert gebildet.

## 2.2. Synthese von aktiven Derivaten des polyvalenten Inhibitors aus Rinderorganen

Das aktive Zentrum des Inhibitors wird gebildet vom $Lys^{15}$-Rest (40 u. 46). Bei Umsetzung mit einem elektrophilen Agens, das nur die freien Aminogruppen des Hemmstoffs angreift, geht dessen Hemmverhalten vollständig verloren. Setzt man das Inhibitormolekül dagegen im Komplex mit dem Enzym um, so behält es seine biologische Aktivität. Durch Studien eines derart modifizierten Inhibitors hat man gefunden, daß das $Lys^{15}$ nicht substituiert wurde. Dieses Verhalten läßt sich nur so erklären, daß das $Lys^{15}$ im Komplex eine ganz besondere Lage einnimmt, an die elektrophile Agenzien aus räumlichen Gründen nicht angreifen können. Aus diesen Gegebenheiten erklärt sich, warum man aktive Derivate nur durch Substitution am Komplex erhalten kann.

### 2.2.1. Synthese des Succinylinhibitors

**Bildung des inaktiven Trypsin-Inhibitor-Komplexes**

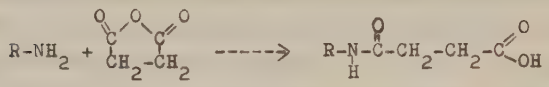
In 30 ml 0,1 M eisgekühlter $NaHCO_3$ Pufferlösung (pH 8,5) gibt man 750 mg Trypsin und rührt 5 min mit dem Mangnetrührer, um das Eiweiß in Lösung zu bringen. Gleichzeitig gibt man einen Tropfen Octanol hinzu, um die Schaumbildung zu verhindern. Danach setzt man 200 mg Kallikrein - Trypsin Inhibitor (BAYER-Werk, Elberfeld) dazu. Das Verhältnis von Inhibitor( MG 6513) soll dabei zum Enzym( MG 23900) wie 1:1 betragen. Der eisgekühlten Lösung werden kleine Proben von 0,1 ml entnommen und am Eppendorf-Photometer (Netheler und Hinz) auf enzymatische bzw. inhibitorische Aktivität mit dem Substrat BAPNA getestet. Man gibt solange kleine Mengen von Enzym oder Inhibitor zu, bis keine Aktivität mehr nachzuweisen ist.

Umsetzung des inaktiven Komplexes mit Bernsteinsäureanhydrid

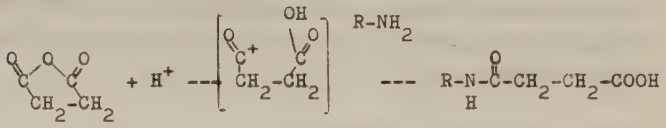
In die eisgekühlte Lösung, die den inaktiven Enzym-Inhibitor Komplex enthält, gibt man unter ständigem Rühren 4 Portionen von 0,5 g Bernsteinsäureanhydrid. Durch die sofort einsetzende Amminolyse und Verseifung des Reagenz beginnt der pH-Wert von

8,5 zu sinken. Da der Komplex sowohl im schwach sauren wie auch im stark alkalischen Bereich dissoziiert, wird der pH-Wert über ein pH-Meter ständig kontrolliert und durch Zugabe von 8 N NaOH im Bereich von pH 8,0 bis pH 8,5 gehalten. Insgesamt werden 2 g Bernsteinsäureanhydrid zugesetzt. Das Ende der Reaktion ist an der Konstanz des pH-Wertes ablesbar.

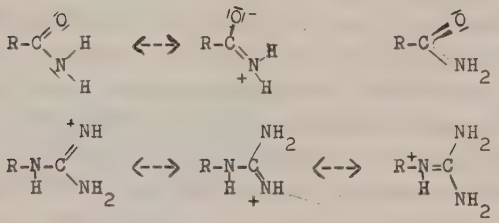
Die dabei ablaufende Reaktion kann wie folgt ausgedrückt werden.



Mechanismus:

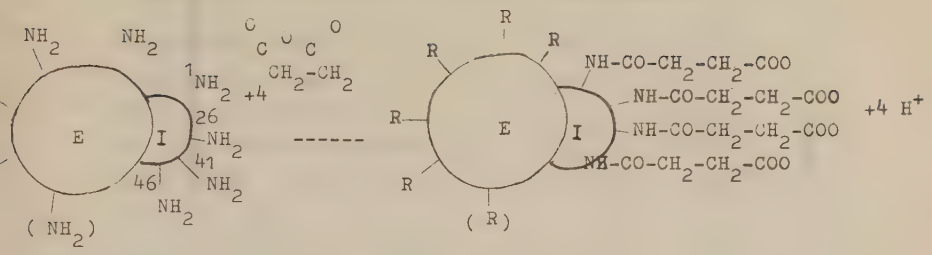


Die anderen im Inhibitor enthaltenen Säureamidgruppen und Guanidinogruppen sind an der Umsetzung nicht beteiligt, da das freie Elektronenpaar des Stickstoffs, wie die mesomeren Formeln zeigen, nicht in dem Maß verfügbar ist wie beim Amin.



Betrachtet man den ganzen Komplex, so zeichnet sich

folgendes Bild ab:




Spaltung des Komplexes

Nach vollständiger Umsetzung gibt man soviel Harnstoff hinzu, daß die Lösung 6 M wird. Bei 100ml Lösung sind das 36 g Harnstoff (MG : 60). Harnstoff spaltet Wasserstoffbrückenbindungen. Unter ständiger Kühlung säuert man die Lösung an, bis sie einen pH von 1,9 erreicht. Dabei fällt bereits ein erheblicher Teil an Trypsin und der Rest der nicht umgesetzten Säure aus. Die vollständige Fällung des Trypsins erzielt man durch Aussalzen mit 2,5 g Ammoniumsulfat. Der Niederschlag wird abgefiltert und die klare Lösung mit 8 N NaOH auf pH 7 eingestellt. Das modifizierte und denaturierte Enzym wird verworfen, der in Lösung gebliebene modifizierte Inhibitor quantitativ bestimmt.

Isolierung des modifizierten Inhibitors

Die neutralisierte Lösung enthält neben dem vollständig acylierten Inhibitor auch partiell acylierten Inhibitor, sowie Spuren des modifizierten Komplexes und in großen Mengen Harstoff und Salze. Die Abtrennung der Nebenprodukte erreicht man mit einem Molekularsieb (Sephadex-G-50) in einer Säule. Die Säule wurde zuvor mit 0,05 M TRA-Puffer pH 7,8 und 0,05 M NaCl äquilibriert. Als Elutionsmittel dient derselbe Puffer. Der Säule angeschlossen ist ein Uvicord Durchflußphotometer (Typ 4701 A LKB-Produktion Stockholm) und ein Fraktionsschneider. Der Uvicord registriert die U.V.Absorption der aus der Säule austretenden Lösung bei 280 nm.

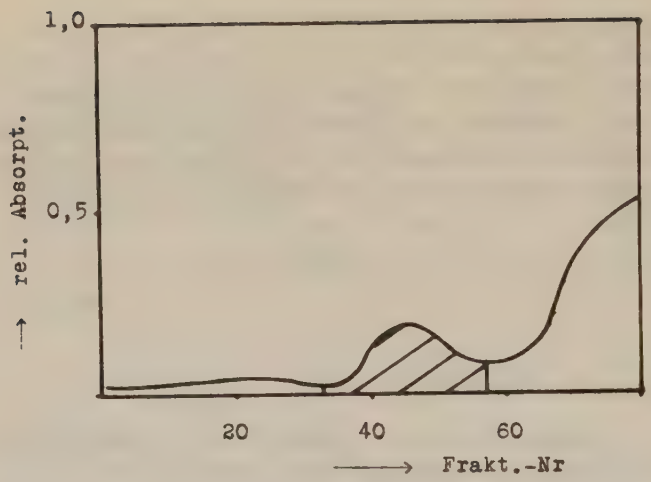



Abb. 5. Trennung des Gemisches durch Gelfiltration (schematische Darstellung).

Der erste kleine Peak entspricht dem inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex. Darauf folgen der Peak des modifizierten Inhibitors anschließend die Salze.

Die Fraktionen, die den Inhibitor enthalten, werden ausgetestet und bei 25 °C am Rotationsverdampfer einrotiert. Zur weiteren Entsalzung des Präparates gibt man die auf etwa 10 ml eingeengte Lösung über eine weitere Sephadex G 50-Säule, die allerdings im Unterschied zur ersten nicht mit einem salzhaltigen Puffer äquilibriert ist. Diesmal benutzt man eine Lösung von 0,01 N Essigsäure.

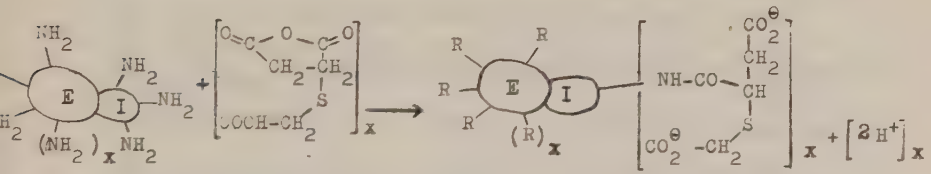
Die auf diese Weise gewonnenen Inhibitorfraktionen werden lyophilisiert und dann im Kühlraum bei t = +4°C zu weiteren Untersuchungen aufbewahrt.

Ausbeuten bei der Synthese von Succinylinhibitor

| | | |
|---|---|---|
| Eingesetzte Menge an Inhibitor: | 750 IU = 200 | = 100 % |
| Nach der Umsetzung | 655 IU = 87,5 % | |
| Nach der Entsalzung | 635 IU = 84,8 % | |
| Nach der Gefriertrocknung (41) | 635 IU = 84,8 % | |
| Spezifische Aktivität | 3600 ImU/ml | |

2.2.2. Synthese des C.M.Succinyl-Inhibitors

Die Synthese dieses aktiven Derivates unterliegt den gleichen experimentellen Bedingungen wie die Umsetzung mit Bernsteinsäure-anhydrid. Als Reagenz verwendet man in diesem Fall das Carboxymethyl-mercapto-bernsteinsäureanhydrid. Es zeichnet sich im wesentlichen gegenüber dem Bernsteinsäureanhydrid durch den Besitz einer weiteren sauren Gruppe aus. Die Reaktion verläuft nach dem gleichen Mechanismus wie die zuerst beschriebene Umsetzung.



Bei der Spaltung und Ausfällung des modifizierten Komplexes ergibt sich insofern eine Besonderheit, als bei pH 1,9 das modifizierte Trypsin nicht quantitativ ausfällt. Durch Zusatz von Trichloressigsäure (Endkonzentration 3% (41)) kann es quantitativ ausgefällt werden.

Die Isolierung des Inhibitors kann man sich erleichtern, indem man Fraktionierung und Entsalzung in einem Schritt vollzieht. Man gibt die slazhaltige Lösung sofort auf die

mit 0,01 M $CH_3COOH$ äquilibrierte Säule und eluiert. Da die Salze langsamer wandern als die Proteine, kann man sie so abtrennen. Man muß aber streng darauf achten, daß die Säule nicht überladen wird. Diese Methode ist gegenüber der zweifachen Säulenpassage einfacher, aber auch weniger genau.

### 2.2.3. Synthese des Homocystein-Inhibitors

Auch die Synthese dieses Inhibitorderivates erfolgt auf sehr ähnlichem Weg wie die Bildung der beiden ersten modifizierten Hemmkörper. Als Reagenz dient das Homocysteinthiolakton, das sich durch leichte Oxydierbarkeit durch Luftsauerstoff auszeichnet. Aus diesem Grunde muß die Reaktion unter $N_2$-Atmosphäre ablaufen. Sobald Luftsauerstoff dazukommt, bilden sich -S-S-Brücken; es hängen sich also mehrere modifizierte Inhibitoren zusammen. Da der Luftsauerstoff nicht mit aller Sicherheit bei der Aufbewahrung und Weiterverarbeitung auszuschließen war, haben sich mit großer Wahrscheinlichkeit Polyinhibitorderivate verschiedener Größe gebildet. Dies zeigt sich auch an den zum Teil sehr unterschiedlichen Verteilungswerten des Inhibitors.

## 2.3. Verteilung und Ausscheidung der neuen Derivate

### 2.3.1. Bestimmung von Leerwerten

Die Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen erfolgte nach der Methode von KEMKES (42). Danach wurde der Inhibitorgehalt zuerst unbehandelter Albinoratten (Stamm Wistar) gemessen und zwar von folgenden Organen: Leber, Lunge, Niere, Milz und Pankreas. Außerdem erstreckte sich die Messung auf den Inhibitorgehalt in Serum und Urin. Das Gewicht der Ratten lag zwischen 250 und 350 g. Ernährt wurden die Tiere mit Altronin$^R$ R-15 Mischfutter. Auf die Bedeutung der Ernährung für die Bestimmung des Urinwertes gehe ich noch ein.

Nach der Dekapitation werden die Tiere entblutet und die Organe entnommen. Die Organe werden entweder sofort weiterverarbeitet oder eingefroren. Von der Leber nimmt man etwa 4 g und zwar sowohl vom rechten als auch vom linken Lappen. Pro Gramm Gewebe gibt man 1 ml aqua dest. und 2 ml 6% Perchlorsäure dazu, so daß zuletzt der Verdünnungsfaktor 4 resultiert. Das Gewebe wird homogenisiert mit dem Ultra-Turrax (Typ 18/2,20 000 U/min, Janke und Kunkel). Die von denaturiertem Eiweiß trübe Lösung wird bei 6000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des klaren Überstandes wird die Lösung durch Zugabe von $K_2CO_3$ neutralisiert und auf pH 7 bis pH 8 eingestellt. Dabei fällt kristallines $K_2ClO_4$ aus. Da dieses Salz ein relativ hohes Löslichkeitsprodukt aufweist und bei Zimmertemperatur erheblich weniger Salz ausfällt als bei 0 °C, kühlt man die neutralisierte Lösung erst bis kurz vor den Gefrierpunkt ab und zentrifugiert in einer Kühlzentrifuge bei -5 °C. Der klare Überstand wird sofort dekantiert. Nach Erwärmen auf Zimmertemperatur ist die Lösung für die Bestimmung des Inhibitorgehaltes fertig. Der Inhibitorgehalt von 1 ml dieser Lösung muß nur noch mit dem Faktor 4 multipliziert werden, um die ImU pro Gramm Gewebe angeben zu können.

Die Bestimmung des Inhibitorgehaltes von Serum unterscheidet sich insofern von der eben genannten Methode, als man das Serum nur 1:1 mit 6% $HClO_4$ versetzt und daher nur den Verdünnungsfaktor 2 erreicht. Die Bestimmung des Inhibitors aus Harn erfolgt ohne Zugabe von $HClO_4$, da ja im Harn gesunder Tiere kein Eiweiß ausgeschieden wird. Da aber die Rattenurine sehr unterschiedliche Bicarbonatmengen aufweisen, empfiehlt es sich $Ca^{2+}$-freien Puffer zu verwenden, da sonst die Lösung von ausfallendem $CaCO_3$ getrübt werden könnte. Dann ist die optische Messung des Inhibitors nicht mehr durchführbar.

| | nach Oppitz | eigene Werte |
|---|---|---|
| Niere | 10 ImU/g | 34 ImU/g |
| Leber | 2 ImU/g | 4.6 ImU/g |
| Lunge | 2 ImU/g | 4.7 ImU/g |
| Milz | 2 ImU/g | 10.3 ImU/g |
| Pankreas | 40 ImU/g | 46 ImU/g |
| Serum | 14 ImU/ml | 12.5 ImU/ml |
| Harn | 0 ImU/ml | 6.6 ImU/ml |

Tabelle 1 Vorkommen von natürlichen Inhibitoren im Organismus der Ratte. Vergleich mit früher bestimmten Werten. Die eigenen Werte ergeben sich durch einfache Mittelung von 4 Messungen.

Die Bestimmungen ergeben sich aus dem Mittelwert von 4 Messungen. Schwankungsbreite der Ergebnisse $\pm$ 10%. Der geringe Inhibitorspiegel von Leber, Lunge und Milz brachten es mit sich, daß sich bei einem Verdünnungsfaktor von 4 zu wenig ImU in einem ml Lösung fanden, um die Messung noch im Bereich des 50% Hemmgrades durchzuführen. Mehr als 1 ml Testlösung kann man nicht zugeben, da sonst die Pufferkapazität des Trapuffers überschritten wird und eine pH-Änderung den Wert verfälscht. Bei Leber und Lunge läßt sich dieses Problem umgehen, indem man den Verdünnungsfaktor 3 wählt. Bei dem kleinen Organ Milz ist das schlecht möglich, da sonst kaum noch Testlösung übrig bleibt. Daher konnten wir den Inhibitorgehalt nicht im 50% Hemmbereich bestimmen. Der wahre Wert des Inhibitorgehaltes der Milz dürfte daher niedriger liegen als wir ihn bestimmt haben.

Verteilung und Ausscheidung der Inhibitorderivate

Männliche Albinoratten vom Stamme Wistar mit einem Gewicht von etwa 300 g wurden in einem Glasgefäß mit etwas Diäthyläther anästhesiert und gewogen. Sie erhielten eine Inhibitordosis von 1000 ImU/100 g Körpergewicht. Die inhibitorhaltige Lösung maß kein größeres Volumen als 1 ml, um den Flüssigkeitshaushalt des Versuchstieres nicht zu beeinflussen. Die Injektion erfolgte nach (42) in die hyperämisierte Schwanzvene der Ratte. Dazu legte man den Schwanz einige Minuten in ein Wasserbad von 50 $^{\circ}$ - 60 $^{\circ}$C.

Die Tiere erholten sich schnell von der Narkose und der Injektion. Unverträglichkeitserscheinungen wurden nicht beobachtet. Die Ratten wurden in einen Stoffwechselkäfig gesetzt; ihr Urin wurde gesammelt. Nach 30 min, 1 Std., 4 Std. und 24 Std. wurden die Tiere getötet und der Inhibitorgehalt wie oben bestimmt. Gefüttert wurden sie nicht, erhielten aber ausreichend Wasser. Dieses Verhalten ergibt sich aus unseren Untersuchungen über einen noch nicht beschriebenen Inhibitor im Rattenfutter Altronin$^{R}$.

2.3.2. Inhibitoraktivität im Rattenfutter

Das Mischfutter Altronin$^{R}$-R-15 enthält neben Eiweiß, Fett und Kohlenhydraten die nötigen Vitamine und Spurenelemente. Leider war nicht zu erfahren, aus welchen Produkten dieses Mischfutter hergestellt wird. Ein Bestandteil ist Fischmehl, wie man durch Geruchsproben leicht feststellen kann; außerdem scheinen Getreidekörner im Futter zu sein. Beim Fressen wird das Futter zerbröselt und mit dem Harn in die Uringefäße eingeschwemmt. Nachdem wir einmal im Urin mehr ImU fanden, als injiziert wurde, untersuchten wir das Futter nach folgender Methodik.

Man zerkleinert 1 g Rattenfutter und läßt es in 10 ml Trapuffer pH 7,8 unter ständigem Rühren 1 Std. lang quellen. Die Suspension wird zentrifugiert und ein Teil der klaren Lösung sofort mit Trypsin und BAPNA ausgetestet. Ein weiterer Teil der Lösung wird im gleichen Volumenverhältnis mit 6% $HClO_4$ behandelt. Dabei fällt ein geringer Niederschlag aus. Nach Neutralisieren, Abzentrifugieren wird die Lösung auf bekannte Weise ausgetestet.

| | ImU/g |
|---|---|
| unbehandelte Lösung | 482 |
| mit $HClO_4$ behandelte Lösung | 58 |

Das Ergebnis stellt den Mittelwert von zwei Bestimmungen dar. Es zeigt, daß mindestens 2 Arten von Inhibitoren im Rattenfutter vorhanden sind, ein säurelabiler, der in diesem Falle in großem Überschuß vorliegt und ein säurestabiler Inhibitor, der nur etwa 1/9 der Gesamtinhibitormenge ausmacht. Die säurelabilen Inhibitoren erweisen sich oft als hochmolekular (43) - sie sind meist pflanzlicher Herkunft -, im Gegensatz zu den niedermolekularen Hemmkörpern, die meist säure- und thermostabil sind. So ist es denkbar, daß der Hauptteil, der im Ratten-

futter gefundenen Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs ist. Weitere Untersuchungen wurden nicht angestellt. Da die Fütterung von Ratten nur die Urinwerte nicht dagegen die Organwerte verfälscht, war eine weitere Klärung des Problems nicht notwendig.

2.3.3. Verteilung des Succinyl-Inhibitors

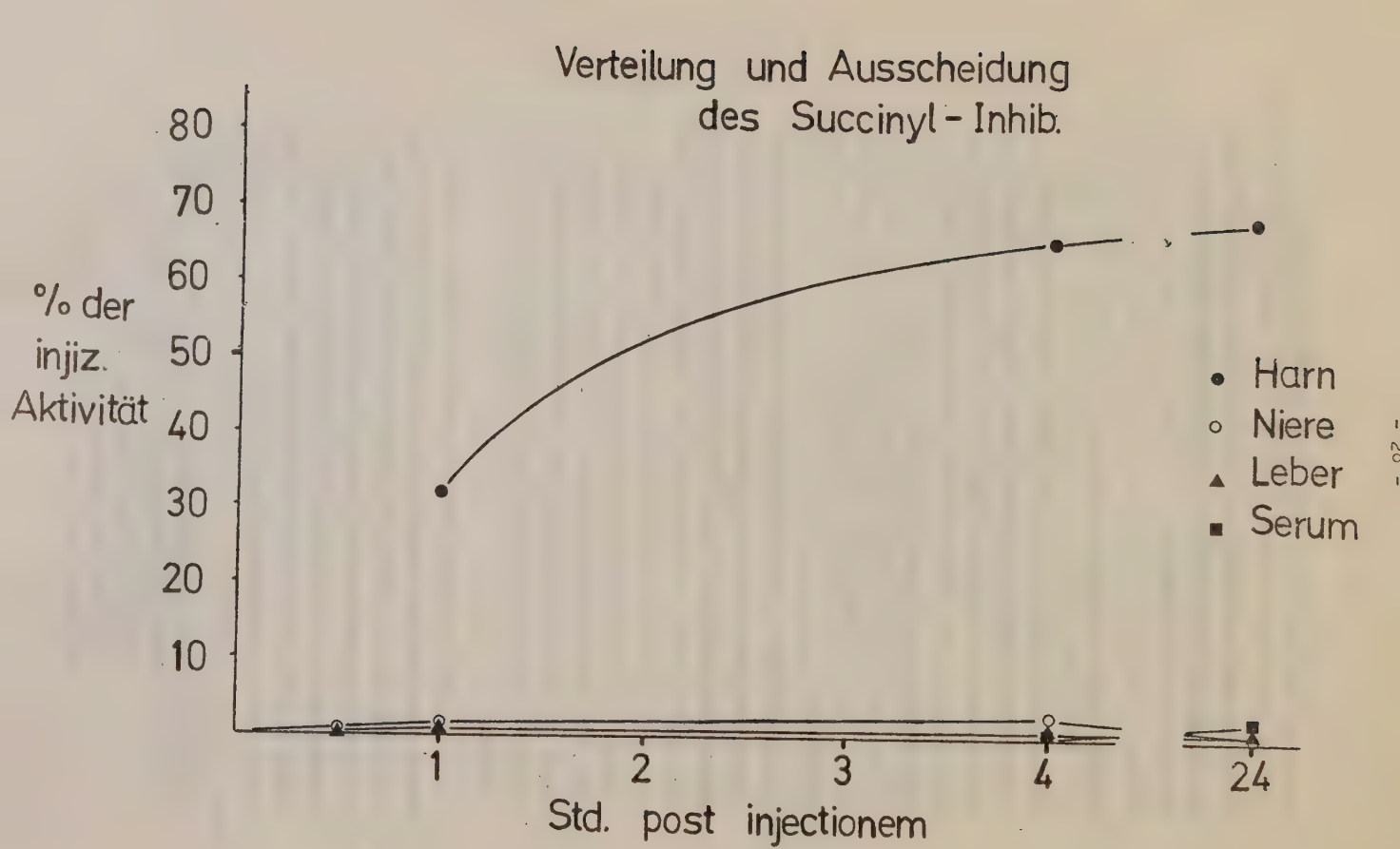
Nachdem die Urinwerte mehrmals durch Futterbestandteile verfälscht wurden, blieben die Tiere von Versuchsbeginn an nüchtern. Wasser erhielten sie in beliebiger Menge. Den Tieren wurden 1000 ImU/100 g Lebendgewicht in die hyperämisierte Schwanzvene injiziert. Nach 30 min, 1 Std, 4 Std. und 24 Std. wurden die Tiere entblutet und die Organe auf die bereits beschriebene Art entnommen und verarbeitet.

Charakteristisch für die Ausscheidung des Succinyl-Inhibitors ist die geringe Speicherung des Inhibitors in der Niere. Die langsam ansteigende Konzentration erreicht mit 3,2% nach 4 Std. ein Maximum und ist nach 24 Std. bereits unter 1% gefallen. Dieses Verhalten stellt einen grundsätzlichen Unterschied zur Verteilung des nativen Inhibitors dar, der geradezu selektiv in der Niere gespeichert wird. 30 min nach Injektion des nativen Inhibitors sind bereits 75% des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors in der Niere fixiert.

Der Succinyl-Inhibitor wird dagegen nur in sehr geringen Mengen in der Niere gespeichert. Er erscheint sehr bald in hohen Dosen im Harn. Die Speicherung in der Leber ist im Vergleich zum nativen Inhibitor auf etwa ein Zehntel herabgesetzt. Die in Lunge, Milz und Pankreas nachweisbaren Inhibitoraktivitäten sind so gering, daß sie im Bereich der Fehlergrenze liegen.

---

Zu Abb. 6: Verteilung des Succinyl-Inhibitors auf Harn, Niere, Serum und Leber der Ratte nach intravenöser Injektion von 1000 ImU/100 g.
Ordinate: Wiedergefundene Aktivität in % bezogen auf die injizierte Aktivität
Abszisse: Zeit nach Injektion in Stunden.


Verteilung und Ausscheidung
des Succinyl - Inhib.
% der injiz. Aktivität
80
70
60
50
40
30
20
10
Harn
Niere
Leber
Serum
1
2
3
4
24
Std. post injectionem

| Zeit | % der injizierten Aktivität in: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nieren | Leber | Lunge | Milz | Pankreas | Serum | Harn | Summe |
| 30 Min. | 1.6 | 0.9 | 0.3 | — | — | — | 0.6 | 3.4 |
| 1 Std. | 2.1 | 1.0 | — | — | 0.1 | — | 32.3 | 35.5 |
| 4 Std. | 3.2 | 1.2 | — | 0.2 | — | 0.6 | 65 | 70.2 |
| 24 Std. | 0.9 | 1.1 | — | — | — | 2.6 | 68.4 | 73 |

Tabelle 2

Verteilung von Succinyl-Inhibitor im Organismus der Ratte nach i.v.-Injektion von 1000 ImU Inhibitorlösung pro 100 g Lebendgewicht. Die wiedergefundene Inhibitoraktivität, ausgedrückt in Prozent der injizierten Aktivität (=100%) wurde aus 2 Meßreihen gemittelt.

| Zeit | ImU/g bzw. ImU/ml in: | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nieren | Leber | Lunge | Milz | Pankreas | Serum | Harn |
| 30 Min. | 30.9 | 2.7 | 5.5 | 2.2 | — | — | — |
| 1 Std. | 27.8 | 2.8 | 1.8 | — | 3 | — | 13.9 |
| 4 Std. | 42 | 3 | 3.1 | 4.4 | — | 1.7 | 23.9 |
| 24 Std. | 11.7 | 3.2 | 0.4 | — | — | 8.9 | 24.6 |

Tabelle 3

Verteilung von Succinyl-Inhibitor im Organismus der Ratte nach i.v.-Injektion von 1000 ImU Inhibitorlösung pro 100 g Lebendgewicht. Die wiedergefundene Inhibitoraktivität wird ausgedrückt in ImU/g bzw. ImU/ml. Die entsprechenden Leerwerte sind substrahiert. Mittelwerte aus den bei Tabelle 2 genannten 2 Meßreihen.

Erstaunlich erscheint der Befund, daß 30 min und 1 Std. p.I. im Serum kein Inhibitor nachweisbar ist. Der native Inhibitor zeigt hier ein anderes Verhalten. Sein Serumspiegel fällt fast exponentiell ab, um bei 24 Std. 0% bis 0,5% der injizierten Aktivität zu erreichen. Das abweichende Verhalten des Succinyl-Inhibitors ist vielleicht so zu interpretieren, daß ein Teil des Inhibitors zunächst in den Extracellularraum wandert, während der größte Teil der Hemmkörper sofort durch die Nieren in den Harn gelangt.

Der in den Extracellularraum abgewanderte Inhibitor erreicht erst im Laufe von Stunden die Blutbahn und ist erst dann wieder im Serum nachweisbar.

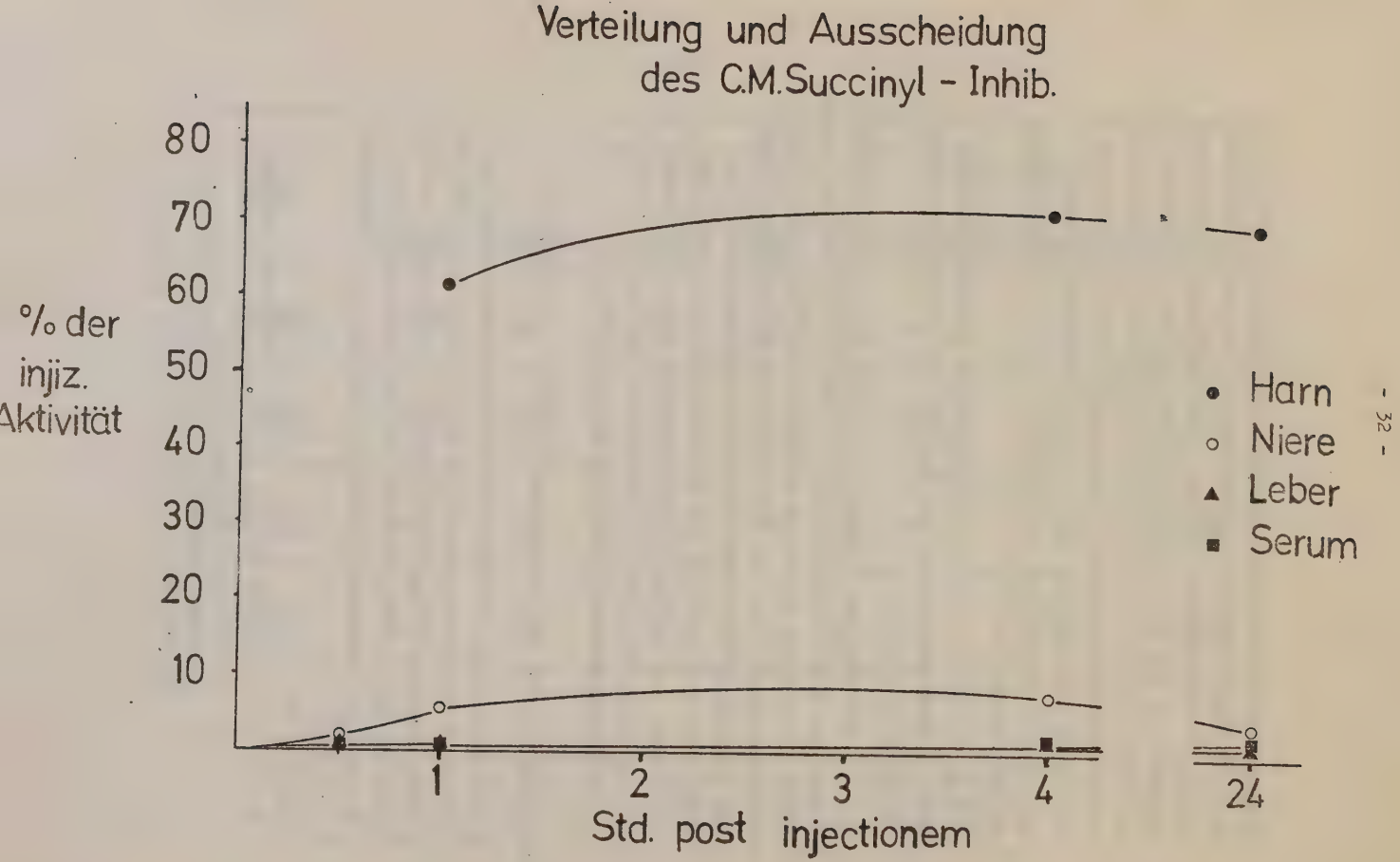
Bei der Gewinnung des Rattenurins ergaben sich weitere Schwierigkeiten. Die Methode, Urin durch Punktion der Blase zu erhalten (36), stellte sich als wenig erfolgreich heraus, da die Blase meistens geleert war. Bei der Narkose mit Diäthyläther konnte man regelmäßig eine Defäkation und Miktion beobachten. Aus diesem Grund führten wir die Narkose in einem besonderen Gefäß durch, aus dem man den Urin ausspülen konnte. So wurde es möglich Inhibitorwerte zu bestimmen, auch wenn das Tier im Stoffwechselkäfig keinen Urin gelassen hatte.

### 2.3.4. Verteilung und Ausscheidung des C.M. Succinyl-Inhibitor

Der C.M. Succinyl-Inhibitor unterscheidet sich vom Succinyl-Inhibitor besonders dadurch, daß er pro Substituent zwei zusätzliche saure Gruppen mehr am Molekül trägt. Damit verändert sich der I.P. von 10,5 des nativen Inhibitors noch mehr in Richtung auf einen sauren Wert als beim Succinyl-Inhibitor.

---

Zu Abb. 7: Verteilung des C.M. Succinyl-Inhibitors auf Harn, Niere, Serum, Leber der Ratte nach i.v. Injektion von 10 000 ImU/kg Lebendgewicht.
Ordinate: Wiedergefundene Aktivität in Prozent bezogen auf die injizierte Aktivität.
Abszisse: Zeit nach der Injektion in Stunden


Verteilung und Ausscheidung
des C.M.Succinyl - Inhib.
% der injiz. Aktivität
80
70
60
50
40
30
20
10
1
2
3
4
24
Std. post injectionem
Harn
Niere
Leber
Serum

| Zeit | % der injizierten Aktivität in: | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nieren | Leber | Lunge | Milz | Pankreas | Serum | Harn | Summe |
| 30 Min. | 2.0 | 0.7 | — | — | — | 0.9 | — | 3.6 |
| 1 Std. | 6.1 | 0.7 | — | — | — | 1.4 | 61.3 | 69.5 |
| 4 Std. | 7.8 | 1.1 | 0.2 | — | — | 1.4 | 70.7 | 79.8 |
| 24 Std. | 4.1 | 1.1 | — | — | — | 2.5 | 69.5 | 77.2 |

Tabelle 4

Verteilung von C.M. Succinyl-Inhibitor im Organismus der Ratte.
Mittelwerte aus 3 Meßreihen. Menge und Methodik wie bei Tab. 2.

| Zeit | ImU/g bzw. ImU/ml in: | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Nieren | Leber | Lunge | Milz | Pankreas | Serum |
| 30 Min. | 24.7 | 2.3 | — | — | — | 2.9 |
| 1 Std. | 75 | 2 | — | — | — | 4.6 |
| 4 Std. | 116 | 3.6 | 4.1 | — | — | 5.1 |
| 24 Std. | 71.4 | 3.9 | — | — | — | 9.3 |

Tabelle 5.

Verteilung von C.M. Succinyl-Inhibitor im Organismus der Ratte. Menge und Methodik wie bei Tabelle 2. Mittelwerte aus den bei Tab. 3 genannten 3 Meßreihen.

Die Nieren enthalten von diesem Inhibitor im Vergleich zum Succinyl-Inhibitor mehr, obwohl sie noch lange nicht die Werte des nativen Inhibitors erreichen. Das Maximum der Inhibitorkonzentration liegt wie beim Succinyl-Inhibitor bei 4 Std. Die Leber weist keinen signifikanten Unterschied zur Aufnahme des Succinyl-Inhibitors auf. Ebenso sind auch Lunge, Milz und Pankreas am ganzen Prozeß unbeteiligt. Im Serum findet man eine ansteigende Tendenz. Ein ähnliches Verhalten wurde von OPPITZ berichtet, der u.a. über die Verteilung und Ausscheidung des Maleoyl-Inhibitors gearbeitet hat (36).

Die Ausscheidung des C.M.Succinyl-Inhibitors in den Harn ist dadurch ausgezeichnet, daß bereits 1 Std. post injektionem über 60% der injizierten Aktivität dort nachzuweisen sind. Das ist wesentlich mehr, als zum gleichen Zeitpunkt an Succinyl-Inhibitor zu finden ist. Die übrigen Werte des C.M. Succinyl-Inhibitors liegen geringgradig höher als beim Succinyl-Inhibitor. Abschließend läßt sich sagen, daß die Ausscheidung von C.M.Succinyl-Inhibitor in den Harn schneller erfolgt und auch nach 4 bzw. 24 Std. um einige Prozent höher liegt als beim Succinyl-Inhibitor. In dieser Eigenschaft unterscheidet er sich auch vom Maleoyl-Inhibitor.

### 2.3.5. Verteilung und Ausscheidung des Homocystein-Inhibitors

Die Ausscheidung dieses Derivates erscheint durch die freie SH Gruppe interessant, die das Molekül durch die Umsetzung erhält. Da sich zwei freie Sulfhydrilgruppen unter Bildung einer Disulfidbrücke vereinigen können, ist eine Dimerisierung bzw. Polymerisierung des Moleküls durchaus denkbar. Da das Molekül aber keine zusätzlichen sauren Gruppen enthält, die die Nierengängigkeit beeinflussen könnten, beschränkten wir unsere Messungen auf einen 24 Std.-Wert.

Man erkennt, daß die Niere etwa ein Drittel der injizierten Aktivität fixiert, während ein anderes Drittel im Harn zu finden ist. Die anderen Werte von Leber, Lunge, Milz, Pankreas und Serum verhalten sich im Rahmen der Norm.

| | % der inj. Aktivität nach 24 Std. | ImU/g bzw. ImU/ml nach 24 Std. |
|---|---|---|
| Niere | 30.6 | 410 |
| Leber | 3.8 | 11.4 |
| Lunge | — | 2.6 |
| Milz | — | 2.2 |
| Pankreas | 0.2 | 5.6 |
| Serum | 4.4 | 15 |
| Harn | 29.7 | — |

Tabelle 6

Verteilung von Homocystein-Inhibitor im Organismus der Ratte. Menge und Methodik wie bei den bisher genannten beiden Verteilungstabellen.

## 2.4. Diskussion

### 2.4.1. Synthese der aktiven Derivate

Zur Darstellung aktiver Derivate des polyvalenten Proteasen-(Succinyl-, C.M. Succinyl-, Homocystein-) Inhibitors bedienten wir uns der auf Seite 18 ff. beschriebenen Methode. Dabei setzt man unter entsprechenden Reaktionsbedingungen Trypsin-Inhibitor-Komplexe mit elektrophilen, z.B. acylierenden Agentien wie Bernsteinsäureanhydrid, Carboxymethylmercaptobernsteinsäureanhydrid und Homocysteinthiolakton um. Dabei werden alle freien Aminogruppen im Inhibitor und Trypsinmolekül umgesetzt, wie sich auch am elektrophoretischen Verhalten der Inhibitorderivate zeigt (41 und 47). Die Aminogruppe des Inhibitors, die bei der Umsetzung nicht reagieren kann, gehört dem $Lys^{15}$-Rest an, wie ARCHER und CHAUVET (4Q) nachweisen konnten. Aus diesen und anderen Befunden schließt man, daß der $Lys^{15}$-Rest für die Bindung des Inhibitors an das Enzym entscheidend ist und das reaktive Zentrum darstellt.

Nach der Umsetzung des Enzym-Inhibitor-Komplexes mit den genannten Reagentien wird der Komplex dissoziiert und das modifizierte Trypsin durch Sättigung mit Ammoniumsulfat bei pH 1,7 gefällt. Da das Trypsin fast das vierfache Molekulargewicht des Inhibitors aufweist, fällt es unter diesen Bedingungen vollständig aus, während der viel kleinere modifizierte Inhibitor noch in Lösung bleibt. Während der mit Bernsteinsäureanhydrid und Homocysteinthiolakton umgesetzte Komplex unter diesen Bedingungen dissoziiert und das modifizierte Trypsin quantitativ ausfällt, macht das mit Carboxymethylmercaptobernsteinsäureanhydrid acylierte Trypsin hierbei eine Ausnahme. Es bedarf noch eines Zusatzes von Trichloressigsäure (Endkonzentration 3%) zur vollständigen Ausfällung.

Die weitere Reinigung und Isolierung der Präparate erfolgte mit der bekannten Methode der Gelfiltration. Zum Schluß wurde die gereinigte salzfreie Inhibitorlösung einrotiert, lyophilisiert und das ausfallende weiße Pulver im Kühlraum bei +5 °C aufbewahrt.

Mit dieser Methode wurden aktive Inhibitorderivate erhalten, die sich in entscheidender Weise vom nativen polyvalenten Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen unterscheiden. Dies betrifft sowohl die Basizität und damit die Ladungen, während die Molekülgröße durch die Umsetzungen nur wenig beeinflußt wird (max. 10%).

Der polyvalente Inhibitor wird auf Grund seiner hohen Basizität in den Nieren fixiert. Dies liegt an der im physiologischen pH-Bereich stark positiven Gesamtladung, die dem nativen Inhibitor einen IP von 10,5 verleiht. Durch die Acylierung der Aminogruppen des Inhibitors, wurden 4 positive Ladungen eliminiert und zusätzlich z.B. bei Succinylierung 4 negative Carboxylatgruppen eingeführt. Der Succinyl-Inhibitor hat die nahezu gleiche Ladung wie der schon früher beschriebene Maleoyl-Inhibitor (36). Die beiden Derivate unterscheiden sich nur durch die Doppelbindung im Maleoylrest.

Der C.M. Succinyl-Inhibitor bringt die doppelte Anzahl saurer Gruppen in das Inhibitormolekül, verglichen mit dem Succinyl-Inhibitor. Hiermit verschiebt sich der isoelektrische Punkt noch mehr zur sauren Seite, wie sich auch aus dem elektrophoretischen Verhalten der Präparate ersehen läßt (41,47). Gleichzeitig verändert sich aber auch die Verteilung der Derivate im Organismus der Ratte nach Injektion.

Der Homocystein-Inhibitor nimmt eine Zwischenstellung zu dem C.M. Succinyl- und dem Succinylinhibitor ein. Um ein einheitliches Präparat zu erhalten, muß nicht nur während der Synthese, sondern auch während der Isolierung, der Reinigung, der Lyphilisation und der Aufbewahrung der Luftsauerstoff ferngehalten werden. Dies erreicht man durch Arbeiten unter $N_2$-Atmosphäre. Da aber bei der großen Zahl von Arbeitsgängen der Luftsauerstoff mit Sicherheit nicht vollständig auszuschließen war, dürften sich sowohl intra- als auch intermolekulare Disulfidbrücken gebildet haben. Außerdem oxydiert der Luftsauerstoff SH-Gruppen zu $SO_3H$-Gruppen (Sulfongruppen), die einen ganz anderen pH-Wert besitzen. Die Aussagekraft der Versuche mit dem Homocystein-

Inhibitor ist also wegen seiner Uneinheitlichkeit nicht sehr groß. Wir haben uns daher bei den Tierversuchen auf die Bestimmung eines 24-Stunden-Wertes beschränkt.

### 2.4.2. Verteilung des nativen Inhibitors im Vergleich mit der Verteilung der aktiven Derivate

Die Verteilung und Ausscheidung des nativen Inhibitors im Tierversuch ist schon oft beschrieben worden (26, 36 u. 38). Alle Untersuchungen stimmen dafin überein, daß der native Inhibitor nach intravenöser Applikation rasch die Blutbahn verläßt und über die Nieren ausgeschieden wird. KALLER (48) fand eine stark verzögerte Ausscheidung nach Unterbindung der beiden Nierenarterien. Weiterhin ist von allen Untersuchern festgestellt worden, daß der Inhibitor fast quantitativ in der Niere fixiert wird. WERLE (49) u.a. stellten fest, daß 30 min nach parenteraler Applikation des natürlichen Inhibitors bereits 75% der injizierten Aktivität in den Nieren nachweisbar sind; 1 Std. nach parenteraler Applikation ist dieser Wert schon auf 90% gestiegen. Nach 4 Std. findet man den gleichen Wert, der dann langsam abfällt und nach 24 Std. 64% der injizierten Gesamtaktivität ausmacht.

Der Inhibitorgehalt des Serums nimmt fast in gleichem Maße ab, wie der Inhibitorgehalt der Niere zunimmt. Während man 3 min p.i. 55% der injizierten Menge im Serum wiederfindet, sind es nach 30 min noch 12%, nach 1 Std. noch 4%, um dann nach 4 Std. Werte von etwa 2% zu erreichen. Die Leber nimmt auch relativ viel Inhibitoraktivität auf. In der ersten Stunde findet man Werte von 10...13% der injizierten Aktivität; der Inhibitorgehalt nimmt dann weiter auf 7% nach der 4ten Std. ab. Die Ausscheidung des nativen Inhibitors in den Harn der Ratte ist besonders von TRAUTSCHOLD (50) untersucht worden. Dabei fand man in 6 Tagen eine Ausscheidung von 12% der injizierten Aktivität in biologisch aktiver Form im Harn. Die Messung mit einem tritiummarkierten Inhibitor ergab jedoch in 6 Tagen eine Ausscheidung von 70% der injizierten Radioaktivität.

Vergleicht man diese Befunde mit den Werten der aktiven Derivate, so findet sich als Charakteristikum eine auffallend geringe Speicherung in der Niere und eine erstaunlich hohe Ausscheidung im Harn der Ratten. Der Inhibitorgehalt der Niere steigt dabei langsam bis zum 4 Std.-Wert an, und fällt ab auf den 24 Std.-Wert, der etwa die Hälfte des höchsten Wertes beträgt: So findet man beim Succinyl-Inhibitor nach 30 min 1,6%, nach 1 Std. 2,1% und nach 4 Std. 3,2% der injizierten Aktivität in der Niere. Die vergleichbaren Werte des nativen Inhibitors betragen nach 30 min 75%, 1 Std. 90% und 4 Std. 90% der injizierten Aktivität. Dieser gewaltige Unterschied ergibt sich durch den einfachen "Ersatz" von 4 Aminogruppen durch Carboxylatgruppen.

Beim C.M-Succinyl-Inhibitor finden wir ähnliche Verhältnisse wie beim Succinyl-Inhibitor. Allerdings speichert hier die Niere etwa doppelt soviel Inhibitoren wie beim Succinyl-Inhibitor, was umso erstaunlicher ist, weil der C.M. Succinyl-Inhibitor noch viel saurer ist als der Succinyl-Inhibitor: Und zwar findet man beim C.M. Succinyl-Inhibitor nach 30 min 2,0%, nach 1 Std. 6,1%, nach 4 Std. 7,8 % und nach 24 Std. 4,1% der injizierten Aktivität.

Im Harn findet man die Inhibitormengen, die bei Verwendung der nativen Inhibitoren in der Niere fixiert sind. So findet man sowohl beim Succinyl- als auch beim C.M. Succinyl-Inhibitor etwa gleiche Harnwerte nach 4 und 24 Std. Bemerkenswert ist die besonders rasche Ausscheidung des sauersten Präparates C.M. Succinyl-Inhibitor. Bei diesem Derivat findet man schon 1 Std. p.i. 61,3% der injizierten Aktivität, während es beim Succinyl-Inhibitor nur 32,3% sind.

Die Speicherung in der Leber erscheint nicht von Bedeutung. Die Leber fixiert von beiden Präparaten etwa 1%; bei der injizierten Gesamtaktivität spielt dies kaum eine Rolle. Auch der Inhibitorgehalt des Serums ergibt für die Gesamtbe-

trachtung nichts Wesentliches. Bereits 30 min nach der Injektion lassen sich vom Succinyl-Inhibitor nichts und vom C.M. Succinyl-Inhibitor 0,9% nachweisen. Das schnelle Verschwinden des Inhibitors aus der Blutbahn erklärt sich aus der guten Diffusion in den ECR und aus der schnellen Ausscheidung durch die Niere. Durch Rückdiffusionsvorgänge erhöht sich der Inhibitorgehalt auf Werte von 2.5% nach 24 Std.

Die anderen von uns untersuchten Organe Lunge, Milz, Pankreas nehmen nicht an der Speicherung der injizierten Präparate teil. Ihr Inhibitorgehalt liegt im Rahmen der Fehlergrenze der Methode.

Der Homocysteininhibitor nimmt bei diesen Untersuchungen eine Sonderstellung ein. Durch die leichte Oxidierbarkeit können sich mehrere Moleküle über Disulfidbrücken aneinander lagern. Dadurch entstehen uneinheitliche Präparate. Während die Organbestimmungen einheitliche Werte ergaben, Niere 30,6%, Leber 3,8%, Serum 4,4% der injizierten Aktivität 24 Std. p.i., differierte der Harnwert des Homocysteins um mehrere 100%. Die erste Bestimmung ergab den Wert 8,7%, die zweite Bestimmung ergab 50,7% der Aktivität. Dies ist eventuell mit einem unterschiedlichen Gehalt an Sulfonsäuregruppen zu erklären, da es sich um verschiedene Präparate gehandelt hat. In der Tabelle Nr. 6 haben wir den Mittelwert gewählt. Dieses unterschiedliche Ergebnis ist durch die Aggregatbildung und Verstärkung der Acidität der Inhibitoren zu erklären. Dadurch entstehen in ihrer Zusammensetzung sehr wechselhafte Produkte. Daher beschlossen wir vom Homocystein-Inhibitor nur einen 24 Std.-Wert zu messen (Tabelle 7).

### 2.4.3. Vergleich der Verteiluhg des Maleoyl-Inhibitors mit dem Succinyl-Inhibitor

Die Synthese und die Eigenschaften desMaleoyl-Inhibitors sind in unserem Arbeitskreis ausführlich erarbeitet worden (36, 41). Er wird im Prinzip genauso dargestellt wie der Succinyl-Inhibitor, nur daß man statt Bernsteinsäureanhydrid,

Maleinsäureanhydrid verwendet. Die beiden Inhibitoren unterscheiden sich also nur wenig in ihrer Ladung. Die einer Doppelbindung benachbarte Caboxylatgruppe ist etwas stärker sauer, als die einer Einfachbindung benachbarte Caboxylatgruppe. Der Maleoylinhibitor besitzt 4 Doppelbindungen, 4 -Elektronenpaare mehr als der Succinyl-Inhibitor. Diese Doppelbindungen konnten einen Einfluß auf die Komplexbindungsfähigkeit und auf das Verhalten des Inhibitors im Organismus der Ratte ausüben.

Während der Succinyl-Inhibitor in den Nieren nach 30 min zu 1,6%, nach 1 Std. zu 2,1%, nach 4 Std. zu 3,2% und nach 24 Std zu 0,9 % der injizierten Gesamtaktivität nachzuweisen ist, findet man für den Maleoyl-Inhibitor nach OPPITZ (36) durchwegs höhere Werte. Nach 15 min wurden 4,7%, nach 1 St. 6,5%, 4 Std. 3,7% und 24 Std. 3,0% der injizierten Aktivität in den Nieren gemessen. Auch in der Leber findet man für den Maleoyl-Inhibitor einen konstanten Wert von 2...3%, für den Succinyl-Inhibitor einen Wert um 1% (Tabelle 3) der injizierten Aktivität. Diese Tendenz findet sich auch bei den Serumwerten. Nach der Injektion von Succinyl-Inhibitor, läßt sich 30 min und 1 Std. p.i. kein Inhibitor nachweisen. Erst nach 4 Std. findet man 0,6%, nach 24 Std. 2,6% der Aktivität im Serum. Der Maleoyl-Inhibitor zeigt schon 15 min p.i. 2,8%, nach 1 Std. 2,1 %, nach 4 Std. 1,8% und nach 24 Std. 5,2% der injizierten Aktivität im Serum. Auch diese Meßwerte liegen über den Ergebnissen der Succinylbestimmung, so daß man sie mit der normalen Fehlerbreite und der persönlichen Meßtechnik nicht erklären kann.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Harnwerten. Die 4 bzw. 24 Std.-Werte stimmen praktisch überein. Beim Maleoyl-Inhibitor wurden 63,9% und 67,0%, beim Succinyl-Inhibitor 65 % und 68,4 % gemessen. Der 1 Std.-Wert differiert allerdings auch hier erheblich. Für den Maleoyl-Inhibitor wurde 1 Std. p.i. 13,5%, für den Succinyl-Inhibitor 32,3% gefunden. Diese Differenz läßt sich allerdings auch folgendermaßen

erklären: Eine Stunde p.i. findet man in der bis dahin gebildeten kleinen Harnmenge sehr viele inhibitorische Aktivität. Da die Tiere eine Stunde nach der Injektion oft noch keinen Harn gelassen haben, muß die Blase punktiert werden bzw. der bei der Anästhesie vergossene Urin in einem Gefäß gesammelt werden. Dabei kommt es leicht zu erheblicher unterschiedlichen Meßergebnissen.

| | Succinyl-Inhibitor | | | Maleoyl-Inhibitor | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Niere / | Serum / | Harn | Niere / | Serum / | Harn |
| 30 min | 1,6 | - | 0,6 | | | |
| 1 Std. | 2,1 | - | 32,3 | 6,5 | 2,1 | 13,5 |
| 4 Std. | 3,2 | 0,6 | 65 | 3,7 | 1,8 | 63,9 |
| 24 Std. | 0,9 | 2,6 | 68,4 | 30 | 5,2 | 67,0 |

Tabelle 7: Vergleich der Ausscheidungen Maleoyl-Inhibitor und Succinyl-Inhibitor ausgedrückt in % der injizierten Aktivität

Abschließend kann man in Niere, Leber und Serum eine höhere Aktivität des Maleoyl-Inhibitors feststellen, die etwa das Doppelte bis Dreifache der für den Succinyl-Inhibitor gemessenen Werte ausmacht. Die Abweichungen scheinen über die Fehlerbreite hinauszugehen, die durch die individuelle Meßtechnik entstehen, zumal für die Ausscheidung im Harn sehr ähnliche Werte festgestellt wurden. Ob dieses unterschiedliche Verhalten durch die zusätzlichen 4 - Elektronenpaare des Maleoyl-Inhibitors erklärbar ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Bis heute weiß man noch nicht, an welche Strukturen in den einzelnen Organen sich der Inhibitor bindet.

## 2.5. Zusammenfassung

Die Syntheses folgender modifizierter Inhibitoren wird beschrieben: Succinyl-Inhibitor, C.M.Succinyl-Inhibitor, Homocystein-Inhibitor. Dabei wird der native Inhibitor im Komplex mit Trypsin mit den acylierenden Agentien umgesetzt, danach vom Trypsin dissoziiert und durch Aussalzen und chromatographische Verfahren gereinigt.

Durch Experimente wurde ein weiterer Beweis erbracht, daß $Lys^{15}$ das aktive Zentrum des Inhibitors darstellt.

Die große Basizität des Inhibitors (I.P. = 10,5) scheint der Hauptgrund für die Fixierung der Niere zu sein. Nach Elimination 4 positiver Ladungen und gleichzeitiger Einführung 4 saurer Gruppen pro Inhibitormolekül findet man 4 Std. p.i. 65% der injizierten Aktivität im Harn; nach Einführung von 8 sauren Gruppen findet man 61% der injizierten Aktivität schon nach 1 Std. im Harn wieder. Demgegenüber nimmt der Homocystein-Inhibitor eine Mittelstellung zwischen dem sauren und dem nativen basischen Inhibitor ein.

Der Nebenbefund, daß sich im Rattenfutter Altronin$^{R}$-R-15 sowohl säurelabile als auch säurestabile Inhibitoren befinden, wird für weitere Versuche mit Ratten von Bedeutung sein. Da die Futterreste die Harnwerte mitunter stark verfälschen, ist es empfehlenswert, die Fütterung bei Urinbestimmungen abzusetzen.

Ausblick: Aus den Untersuchungen ergibt sich, daß die Änderung des I.P. des Inhibitors bis zum Neutralbereich genügt, um die Fixierung des Inhibitors in den Nieren zu verhindern.

Sicherlich ist das Präparat auch in der Klinik von Interesse, wenn bei bestimmten Indikationen z.B. urologischen Eingriffen eine Anreicherung des Inhibitors in den ableitenden Harnwegen erwünscht ist und eine Fixierung in den Nieren wegen Thrombosegefahr vermieden werden soll.

## Literaturverzeichnis


1 MARX R., IMDAHL H., HABERLAND G.L. (Herausgeber)
Neue Aspekte der Trasyloltherapie 2
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart

2 SCHMIDT H.: Die Therapie der akuten Pankreatitis
DMW 6, 1970 S. 280

3 HEINKEL, K.: Die akute Pankreatitis aus der Sicht der Inneren Medizin, (lit.cit.[1], S.73)

4 NAGEL M., KARL-SCHUCH W., RAHMANZADEH R.
Untersuchungen zur zusätzlichen Proteaseninhibitortherapie bei der septischen Peritonitis, (lit.cit.[1], S. 129)

5 HABERLAND G.L., MATIS P. (Herausgeber)
Neue Aspekte der Trasyloltherapie 3
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart

6 HABERMANN E.: Probleme der Pathophysiologie des Kininsystems (lit.cit.[5], S.89)

7 GROSS R., KRONEBERG G. (Herausgeber)
Neue Aspekte der Trasyloltherapie 1, Bericht über ein internationales Symposiom in Große Ledder 1965
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart

8 WERLE E.: Kininogenspiegel im menschlichen Serum nach Verkehrsunfällen (lit.cit.[7],S.176)

9 WERLE E.: Kininogenspiegel und Blutdruck beim Schock (lit.cit.[7], S.177)

10 MARX R.: Kallikreininhibitoren als Gerinnungshemmstoffe (lit.cit.[1], S.89)

11 LASCH H.G.: Schock, Hämostase und Mikrozirkulation (lit.cit.[5], S.31)

12 BEGEMANN H., HARTWERT H.B.: Praktische Hämatologie
S. 163, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1969

13 SCHMUTZLER R.: Methodik der Differenzierung hyperfibrinolytischer Zustände und antifibrinolytischer Wirkungen, (lit.cit.[7], S.20)

14 STEICHELE D.F.
Zur Trasylol-Medikation bei Schockzuständen
(lit.cit.[5], S.207)

15 BEGEMANN H., HARWERTH H.G.: Praktische Hämatologie, S. 245
Georg Thieme Verlag Stuttgart

16 BEGEMANN H., HARWERTH H.G.: Praktische Hämatologie, S. 252
Georg Thieme Verlag Stuttgart

17 WITTE S.: Beziehungen von gerinnungsfördernden und -hemmenden
Faktoren zur Fibrinolyse, (lit.cit.[7], S.63)

18 LUDWIG H.: Zur Anwendung von Trasylol in der Geburtshilfe
und Gynäkologie, (lit.cit.[1], S.115)

19 HOFFBAUER H.: Hyperfibrinolytische Blutungen in der Geburtshilfe
und Gynäkologie (lit.cit.[7], S.99)

20 KRAUT H., FREY E.K., WERLE E.: Z. physiol.Chem.192, 1 1930

21 KUNITZ H.J., NORTHROP I.H.: J. gen.Physiol. 19, 991 1936

22 ASTRUP T.: 18th. Int. Physiol. Congress, Copenhagen
Abstracts 1950, S. 81

23 TRAUTSCHOLD I., WERLE E., FRITZ H.: Zur Biochemie des Trasylol
(lit.cit.[7], S. 3)

24 VOGEL R., TRAUTSCHOLD I., WERLE E.: Natürliche Proteinaseninhi-
bitoren, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1966

25 MÜRL F.F., HELLER W.: Zur Pathogenese und Therapie der Fett-
embolie (lit.cit.[5],S.161)

26 HELLER W., MAYER W., MÜRL F.K.: Experimentelle Studien zur
Fettembolie (lit.cit.[5], S. 173)

27 BLÜMEL G.: Die Beeinflussung der Frakturheilung durch natürliche
Proteasenhemmkörper (lit.cit.[5], S.185)

28 VORSTER J.F.: Adhäsionsprophylaxe mit Proteinaseninhibitoren
(lit.cit.[1], S.145)

29 MATIS P.: Symposion über neue Aspekte der Trasylol-Therapie 1969
Med.Welt Nr. 52, 1969

30 KALLER H.: Die Beeinflussung experimentell erzeugter Ödeme durch Trasylol, (lit.cit.[7], S. 152)

31 BLÜMEL G.: Über die mögliche Beteiligung des Kininsystems bei einem chirurgischen Zustandsbild (lit.cit.[5], S.125)

32 LUDWIG H.: Pathogenese und Klinik perinataler Zirkulationsstörungen (lit.cit.[5], S.199)

33 THUNE S., STÖTTER G.: Behandlung des akuten Nierenversagens und der chronischen Niereninsuffizienz mit einer Zusatztherapie von Trasylol, Med.Welt 52, 1969

34 HOLLMANN W., LIESEN H.: Der Einfluß von Trasylol auf Kardiopulmonale Parameter bei dosierter Arbeit (lit.cit.[5], S.75)

35 FREY E.K.: Therapiewoche 4, 323 (1953/54)

36 OPPITZ K.H.: Verteilung und Ausscheidung von natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten Port.-Inhib. nach intravenöser Injektion. Dissertation München 1969

37 WERLE E., TRAUTSCHOLD I.: MMW 103, 773 1961

38 WERLE E.: Zur Biochemie des Trasylol (lit.cit.[5], S.49)

39 FORELL, M.M.: Med. Klin. 57, 864 1962

40 CHAUVET J., ARCHER R.: The reaktive site of the basic Trypsin Inhibitor of Pankreas, J. biol. Chem. 242, 4274 1967

41 SCHULT H.D.: Mündliche Mitteilung

42 KEMKES B.: Mündliche Mitteilung

43 MESSMER K.: Grundlagen der modernen Schocktherapie Münchner med. Wochz. 112, Heft 9

44 FRITZ H.: Habilitationsarbeit, med. Fakultät München 1968

45 KRESS L.F., LASKOWSKI M. sr.: J. Biol.Chem. 242, 4925 1967

46 WERLE E.: Einleitende Bemerkungen, (lit.cit.[7], S. 121)

47 Zetzmann G.: Dissertation in Vorbereitung

48 KALLER H.: Arch. exp. Path. Pharmak. 246, 92 (1963)

49 WERLE E.: Zur Biochemie des Trasylol (5), S. 55

50 TRAUTSCHOLD I., WERLE E., HAENDLE H. und SEBENING H.:
in Henning, Heinkel u. Schon: Pathogenese, Diagnostik,
Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas, S. 289

51 HABERLAND G.L.: Einleitende Bemerkungen zu den Grundlagen der
Trasyloltherapie, (lit.cit[1])

52 CREUTZFELDT W.: Kininfreisetzung bei Pankreatitis
(lit.cit.[5], S. 89)

53 GREEF K.: Der Kininogengehalt des Plasmas beim experimentellen
Schock (lit.cit.[7], S. 135)

# L E B E N S L A U F

Am 23. Juni 1945 wurde ich, Heinrich Kremer, als erster Sohn des Dr.-Ing. Heinrich Kremer und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Herold, in Halle an der Saale geboren. Die ersten zehn Lebensjahre und die Volksschulzeit verbrachte ich in Leer. In Meisenheim am Glan besuchte ich das Paul-Schneider-Gymnasium und erfuhr auch die diejenigen Eindrücke, die mich am stärksten geprägt haben.

Nach der Reifeprüfung 1965 beschloß ich, Medizin zu studieren und ging nach München. Im Herbst 1966 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab, im Frühjahr 1968 die ärztliche Vorprüfung.

Im Sommer 1970 habe ich cand.med. Gundula Zetzmann geheiratet.

1972 legte ich die Prüfung zum Staatsexamen ab.

München, August 1972